

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

Das Verhalten des alpha-Toxins von Clostridium (Cl.)
welchii (perfringens) Typ A bei Einwirkung
verschiedener Pufferlösungen, Natriumcitrat
und Trypsin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Ursula Mechler geb. Gossert
Tierärztin aus Lodz

Berlin 1971
Journal-Nr. 742



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

Das Verhalten des alpha-Toxins von Clostridium (Cl.)
welchii (perfringens) Typ A bei Einwirkung
verschiedener Pufferlösungen, Natriumcitrat
und Trypsin

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Ursula Mechler geb. Gossert
Tierärztin aus Lodz

Berlin 1971
Journal-Nr. 742

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent: Prof. Dr. Dr. M. Lerche



Tag der Promotion: 13. Juli 1971

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	5
II. Literatur	6
A. Haemolytische Eigenschaften	6
B. Lecithinase-Eigenschaften	7
C. Hyaluronidase-Eigenschaften	8
D. Vorkommen der 3 Toxine bei den A-Stämmen	9
E. Wirkung verschiedener Verdünnungsmittel auf Haemolyse- und LV-Aktivität	9
F. Trypsinwirkung	11
G. Letale Eigenschaft des alpha-Toxins	12
H. Nekrotisierende Eigenschaften	12
III. Eigene Untersuchungen	13
A. Material	14
B. Technik und Methodik	15
1. Herstellung von Kulturfiltraten	15
2. Verdünnungsmittel	16
a. Boratpuffer	16
b. Phosthio	16
c. Cagsal	17
3. Trypsinierung	17
4. Letalitätstest	18
5. Haemolyse-Röhrchentest	18
6. Haemolyse-Blättchentest	18
7. Lecithovitellin-Röhrchentest	19
8. Lecithovitellin-Blättchentest	19
9. Nekrosetest	20
10. Herstellung der Kulturfiltratkonzentrate	20

	Seite
C. Ergebnisse	21
1. Mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnte Kulturfiltrate	21
2. Mit verschiedenen Pufferlösungen verdünnte Kulturfiltrate	23
a. Phosphatpuffer	23
b. Boratpuffer pH 8,0 mit 0,05 % CaCl_2 - Zusatz	25
c. Boratpuffer pH 8,0 ohne CaCl_2 -Zusatz	26
3. Mit Cagsal und Phosthio verdünnte Kulturfiltrate	27
4. Mit 3,8 %iger Na-Citrat-Lösung verdünnte Kulturfiltrate	28
5. Mit Trypsin behandelte Kulturfiltrate	29
6. Wirksamkeit dialysierter Konzentrate bei NaCl und Cagsal	31
7. Wirksamkeit dialysierter Kulturfiltrate nach Trypsinierung	32
IV. Besprechung	34
V. Zusammenfassung	40
VI. Literaturverzeichnis	42

E i n l e i t u n g

Das alpha-Toxin des Cl.welchii wird in besonders großer Menge vom A-Typ gebildet und ist das einzige Major-Toxin dieses Types. Neben dem alpha-Toxin ist der A-Typ noch durch eine Reihe von Minor-Toxinen charakterisiert, von denen das theta-Toxin ebenso wie das alpha-Toxin haemolisierend wirkt.

Die Trennung beider Toxine ist schwierig und könnte erleichtert werden, wenn es gelingen würde, durch Beigabe bestimmter Mittel zu den Kulturfiltraten eines der beiden Toxine unwirksam zu machen.

Vom alpha-Toxin ist bekannt, daß es in seiner Wirkung durch Kalziumsalze verstärkt und durch Pufferlösungen, Trypsin und Natriumzitrat vermindert werden kann. Ob es möglich ist, durch die letztgenannten Mittel die Wirksamkeit des alpha-Toxins überhaupt aufzuheben, wird in der Literatur widersprechend beantwortet.

Meine Versuche hatten das Ziel, an einer Zahl von A-Stämmen des Cl.welchii festzustellen, inwieweit durch die in der Literatur erwähnten Mittel das alpha-Toxin in seiner Wirkung verstärkt oder vermindert werden kann.

L i t e r a t u r

Das alpha-Toxin wird von allen 5 Typen des *Cl.welchii* gebildet. Der A-Typ soll es aber nach OAKLEY und WARRACK (1941) in größter Menge bilden. Als Lecithinase C (MACFARLANE und KNIGHT, 1941) wirkt es haemolysierend, opaleszierend, letal und nekrotisierend. Alle Toxine des *Cl.welchii* sind Ektotoxine. Nach OAKLEY (1943) und VAN HEYNINGEN (1950) haben sie Eiweißcharakter.

A Haemolytische Eigenschaften

Die haemolytische Aktivität des alpha-Toxins von *Cl.welchii* ist an das Vorhandensein von Ca-Ionen gebunden (OAKLEY und WARRACK, 1941). Bei geringer Ca-Ionenkonzentration kommt es bei Kaninchen-, Meerschweinchen-, Schaf-, Schweine-, Rinder-, Menschen-, und Mäuseerythrozyten durch das alpha-Toxin zur Haemolyse. Ziegen- und Pferdeerythrozyten hingegen werden nur bei hoher Ca-Ionenkonzentration haemolysiert (EVANS, 1947).

Nach VAN HEYNINGEN (1950) spielt das hot-cold-Phänomen bei der Haemolyse eine große Rolle. Niedrige alpha-Toxinkonzentrationen rufen nach Aufbewahrung bei $+37^{\circ}\text{C}$ unter Umständen keine Haemolyse hervor. Doch kann in solchem Fall noch eine Haemolyse eintreten, wenn die Toxin-Blutkörperchenmischung bei Raumtemperatur aufbewahrt wird. BURROW (1959) erzielte das hot-cold-Phänomen auch bei Aufbewahrung der Gemische im Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$.

OAKLEY und WARRACK (1953) stellten fest, daß der Nachweis der Lecithinase (alpha-Toxin) durch vorhandenes theta-Toxin gestört werden kann. Nach TODD (1941) ist das theta-Toxin ein sauerstoffempfindliches und thermolabiles Haemolysin. Bei Herstellung der Kulturfiltrate unter aeroben Bedingungen ist in der Regel nicht mehr mit dem Vorhandensein des theta-Toxins zu rechnen (VAN HEYNINGEN, 1941). Die haemoly-

tische Wirkung des theta-Toxins ist nicht von Ca-Ionen abhängig. Eliminiert man die Ca-Ionen durch Phosphatpuffer, kann man die alpha-Toxinwirkung von der theta-Toxinwirkung trennen (MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON, 1941; OAKLEY und WARRACK, 1941; EVANS, 1945).

B Lecithinase-Eigenschaften

Für den Nachweis des alpha-Toxins ist nach MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON (1941) der Lecithovitellintest (L.V.-Test) besonders geeignet.

VAN HEYNINGEN (1941) erzielte den Opaleszenzeffekt mit einer standardisierten Eidotteremulsion, während MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON (1941) mit einer Mischung von Hühnereidotter und physiologischer Kochsalzlösung arbeiteten.

Die opaleszierende Eigenschaft ist ebenfalls an das Vorhandensein von Ca-Ionen gebunden und beruht nach MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON (1941) darauf, daß die Lecithinase aus Lipoprotein des Eigelbs durch Hydrolyse Fett abspaltet, wobei eines der Abbauprodukte ein Diglycerid ist (MACFARLANE und KNIGHT, 1941). Bei geringer alpha-Toxinkonzentration kommt es erst nach 24 Stunden zur Ausbildung eines deutlichen opaleszierenden Effektes (MACFARLANE und Mitarbeiter, 1941). LONG und MAGUIRE (1953) fanden, daß nur solche Lecithine vom alpha-Toxin hydrolytisch gespalten werden, die ungesättigte Fettsäuren enthalten.

Nach MACFARLANE (1942, 1948a) wird nicht nur Lecithin, sondern auch Sphingomyelin von alpha-Toxin hydrolytisch gespalten und zwar in Phosphorylcholin und Lingocerylsphingosin. Diese Reaktion verläuft sehr langsam.

EVANS (1943) ermittelte die Konzentration des alpha-Toxins im Überstand eines Kulturzentrifugates mit dem LV-Test durch Bestimmung der Anzahl der Einheiten des alpha-Antitoxins,

die zur Neutralisation des alpha-Toxins in 1 ml notwendig waren. Desgleichen wurden die theta-Haemolysinkonzentrationen durch die Anzahl der provisorischen Einheiten von theta-Antihaemolysin bestimmt. Diese Bestimmung wurde mit einer etwa 1,5 %igen roten Blutkörperchensuspension von Schafen durchgeführt. Herstellung der Blutsuspension und Verdünnung des theta-Antihaemolysins wurden mit isotonischen M/15 Phosphatpuffern mit einem pH von 6,5 zwecks Ausschaltung des alpha-Toxins nach VAN HEYNINGEN (1941) vorgenommen.

A-Stämme, die in Fällen von Lebensmittelvergiftungen isoliert wurden und eine besondere Thermoresistenz aufwiesen, bildeten nach WILLIS (1969) kein theta-Toxin.

SHELDON, MOSKOWITZ und DEVERELL (1959) beschrieben eine Agar-Diffusions-Methode für die Bestimmung des alpha-Toxins von *Cl.welchii*. Dabei werden Probeblättchen mit der Toxin-Präparation befeuchtet und auf die Oberfläche von Eidotter-Agarplatten gelegt. Nach 24 Stunden bilden sich Reaktionszonen, die mit der Toxinkonzentration in linearer Beziehung stehen.

C Hyaluronidase-Eigenschaften

Als dritte Antigenkomponente der A-Stämme des *Cl.welchii* ist die Hyaluronidase in Betracht zu ziehen. EVANS (1945) stellte die Hyaluronidasekonzentration der überstehenden Flüssigkeit seines Kulturzentrifugates mittels des Mucin-Gerinnungs-Verhütungstestes (MAC CLEAN, 1943) durch Bestimmung der Anzahl provisorischer Antihyaluronidaseeinheiten fest, die zur Neutralisierung der Hyaluronidase-Wirkung in 1 ml der überstehenden Flüssigkeit nötig sind.

D Vorkommen der 3 Toxine bei den A-Stämmen

EVANS (1945) untersuchte 30 A-Stämme von *Cl. welchii*. Unter Zugrundelegung ihrer in vitro-Eigenschaften teilte er sie in 3 Gruppen ein:

- | | |
|-----------------|---|
| <u>Gruppe 1</u> | A-Stämme, die alle 3 Antigene erzeugen (alpha-Toxin, theta-Haemolysin und Hyaluronidase). |
| <u>Gruppe 2</u> | A-Stämme, die alpha-Toxin und theta-Haemolysin, aber keine Hyaluronidase erzeugen. |
| <u>Gruppe 3</u> | A-Stämme, die nur alpha-Toxin erzeugen. |

A-Stämme, die alpha-Toxin und Hyaluronidase bilden, jedoch kein theta-Haemolysin erzeugen, kamen nicht vor. EVANS verimpfte einen A-Stamm, der alpha-Toxin und theta-Haemolysin bildete, auf eine Pferdeblutagarplatte, der 0,5 % CaCl_2 zugesetzt war. Die nach Bebrütung aufgegangenen Kolonien waren von einer schmalen Zone vollständiger Haemolyse umgeben. Um diese Zone zeigte sich eine ausgedehnte Zone partieller Haemolyse. EVANS führte die partielle Haemolyse auf das alpha-Toxin und die vollständige Haemolyse auf das theta-Toxin zurück.

E Wirkung verschiedener Verdünnungsmittel auf die Haemolyse- und LV-Aktivität

Die für den LV-Test erforderliche Eigelbemulsion wird nach MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON (1941) durch Schlagen eines Eidotters in 250 ml physiologischer Kochsalzlösung und Filtrieren des Gemisches durch einen Seitz-Filter hergestellt. Die klare, gelbliche Lösung ist bei Erhaltung der Sterilität lange haltbar, so daß sich ein Konservierungsschutzmittel erübrigt. Bringt man in die Eigelblösung das Kulturfiltrat mit alpha-Toxin ein, so tritt selbst in der Kälte innerhalb weniger Minuten eine Opaleszenz auf, die sich in einer Aus-

flockung und einer dicken Fettschicht zeigt. Ist die alpha-Toxinkonzentration gering, entsteht an der Oberfläche nur eine geringe Fettschicht oder eine Flockung. Der Endpunkt der sichtbaren alpha-Toxinwirkung ist erreicht, wenn sich nach 24 Stunden in dem Gemisch eine Opaleszenz ausbildet.

MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON (1941) konnten die haemolytische und opaleszierende Wirkung des alpha-Toxins von Cl.-welchii durch Na-Fluorid und in weit geringerem Maße durch K-Cyanid verhindern. Sie sprachen von Enzym-Inhibitoren und verwendeten als solche auch K-Oxalat, Di-Na-Phosphat und Na-Citrat. In 2 Fällen gelang es ihnen, den Ca-Gehalt des Toxins durch Ausfällen mit NH_4 -Oxalat und darauffolgender Dialyse so zu verringern, daß 1 ml Toxin keine Haemolyse bei 0,5 ml einer 8 %igen Suspension roter Schafblutzellen mehr hervorrief. Der Zusatz von 2 Gamma Kalzium je ml Toxin führte wieder zur Haemolyse. Dieses Versuchsergebnis ließ sich im LV-Test mit Serum oder Lecithovitellinen nicht reproduzieren, da das Kalzium aus dem Lecithovitellin nicht vollständig entfernt werden konnte.

Nach OAKLEY und WARRACK (1953) können Ca-Ionen durch Mg-Ionen ersetzt werden. Oxalate, Phosphate und Fluoride fällen Kalzium, Citrate hemmen die Ionisation des Kalziums. Daraus ergibt sich, daß die minimale haemolytische Dosis zunimmt, wenn man die genannten Substanzen zur Verdünnung der Toxinfiltrate verwendet. PENFOLD (1941) stellte fest, daß durch Fällung hergestellte Toxine, die in Phosphatpuffern oder Salzlösungen gelöst wurden, eine nur schwache haemolytische Aktivität entfalten. In Bouillon oder Serum gelöste Toxine hingegen erwiesen sich durch Gehalt an Ca-Ionen haemolytisch aktiver. Demzufolge sind Ca- oder Mg-Ionen notwendig, um die enzymatische Reaktion des alpha-Toxins des Cl.-welchii zu aktivieren. Sie wirken bei der enzymatischen Spaltung des Lecithins in Phosphorcholin und Diglycerid als Katalysatoren.

F Trypsinwirkung

Das alpha-Toxin besteht als Enzym aus einer Eiweißkomponente und einer prosthetischen Gruppe. Wird Trypsin als eiweißspaltendes Ferment (Endopeptidase) dem alpha-Toxin zugegeben, dürfte es den Eiweißkörper der Lecithinase spalten und damit ihre Wirksamkeit aufheben.

AL-KHATIB (1964) fügte seinen toxinhaltigen Kulturfiltraten 1 Gewichtsprozent Trypsinpulver bei und stellte eine Verringerung der alpha-Toxinaktivität fest.

KÖHLER und BAUMGART (1970) ließen 0,1 %ige Trypsinlösung auf ein Typ-A-Kulturfiltrat 1 Stunde im Brutschrank bei $+37^{\circ}\text{C}$ einwirken und bestimmten die Dosis letalis minima und titrierten das Toxin im LV-Test. Sie stellten fest, daß die Toxine zwar einen gewissen Verlust an Wirksamkeit erlitten, aber noch wirksam waren. Das gleiche Ergebnis erzielten auch HOBBS und Mitarbeiter (1953) bei ihren Food Poisoning-Stämmen von menschlichen Lebensmittelvergiftungen.

GOEVA und Mitarbeiter (1968) fanden bei 7 % der von ihnen untersuchten Cl.welchii-Stämme von Typ-A ein trypsinbeständiges Toxin.

LENKOV und Mitarbeiter (1966) wiesen als Ursache einer Cl.-welchii-Typ-A-Enterotoxaemie bei Kälbern eine sogenannte atypische Variante des Types-A nach, die sich durch hohe Trypsinbeständigkeit auszeichnete. Die Trypsinresistenz derartiger A-Stämme erhöht die Haltbarkeit des Toxins im Darm und erklärt möglicherweise ihre Pathogenität.

Aus den Arbeiten von WILLIS und GOWLAND (1962) geht hervor, daß ein großer Anteil des Undurchsichtigkeitsmaterials, besonders in Eidotter-Emulsionen, durch Protein bedingt ist. Sie trypsinierten eine Eidotteragarplatte, die durch Behandlung mit Cl.welchii-alpha-Toxin undurchsichtig geworden war, und fanden, daß dadurch die Undurchsichtigkeit vermindert wurde. Alpha-Toxin produzierte ebenfalls eine weniger inten-

sive Undurchsichtigkeit auf trypsinierten Eidotteragarplatten (proteinfreier Eidotteragar). Sie schlossen aus Untersuchungen der alpha-Toxinwirkung auf ätherextrahierten Teilen von Eidotter, daß die Lecithinase-C-Undurchsichtigkeit in der Eidotteremulsion 3 Ursachen haben kann:

1. Fett stammt vom freien Lecithin als ein Abbauprodukt dieser Substanz.
2. Freie Fette in den Eidotteremulsionen vereinigen sich nach der Aufspaltung.
3. Wasserlösliche Proteine gerinnen, möglicherweise an Diglycerid gebunden, mit den unlöslichen freien Fetten.

G Letale Eigenschaft des alpha-Toxins

Die letale Wirkung des alpha-Toxins wird durch intravenöse Injektionen der Kulturfiltrate in eine Schwanzvene oder durch intraperitoneale Injektion bei weißen Mäusen durchgeführt. Bei der letalen Wirkung des alpha-Toxins werden wahrscheinlich, wie bei der Haemolyse, Lipoproteinkomplexe der Körperzellen durch die Lecithinase zerstört (KIELLEY und MEYERHOF, 1948/50; MACFARLANE, 1950).

WEINBERG und BAROTTE (1929 a, b) fanden, daß Haemolyse- und Letalwerte bei Cl.welchii-Filtraten einander nicht entsprechen. Andere Autoren betonen, daß eine Parallelität der Ergebnisse beider Tests besteht.

H Nekrotisierende Eigenschaften

Der intradermale Nekrosetest wurde zuerst von KOSE (1916) entwickelt.

GLENNY, LLEWELLYN-JONES und MASON (1931) beschrieben die entzündlichen, nekrotisierenden Veränderungen, die durch das alpha-Toxin des Cl.welchii hervorgerufen werden. Den Nekrosen geht eine erhöhte Permeabilität der Blutkapillaren in der

Haut voraus, die nach ELDER und MILES (1957) auf die Wirkung des alpha-Toxins zurückzuführen ist.

ROBERTS (1959) empfiehlt den Hautnekrosetest am Meerschweinchen und Kaninchen für die Typendifferenzierung der Cl. welchii-Toxine und hält ihn für empfindlicher reagierend als den Letaltest.

MATTHES (1965) untersuchte Leber-Leber-Bouillon-Kulturfiltrate verschiedener Cl. welchii-Typen mit dem Intracutantest am Kaninchen und beschrieb die Hautveränderungen mit ihren für die einzelnen Typen von Cl. welchii charakteristischen Merkmalen. Er hielt den Hautnekrosetest zwar für eine nicht vollständig sichere, aber für Routineuntersuchungen brauchbare Methode zur Differenzierung der Cl. welchii-Typen.

FRANKE (1968) führte Hautnekroseteste am Meerschweinchen durch. Seine Untersuchungen schienen ROBERT's Ansicht zu bestätigen, daß die Nekroseteste empfindlicher sind als die Letalteste.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

Die Kulturfiltrate von 10 A-Stämmen wurden zunächst auf ihren alpha-Toxingehalt unter Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung als Verdünnungsmittel durch den Mäuseletaltest, den Hautnekrosetest am Meerschweinchen, den Haemolyse-(Röhrchen- und Blättchentest) und Lecithovitellintest (Röhrchen- und Blättchentest) vergleichend geprüft. Mittels Haemolyse- und Lecithovitellintest war dann weiterhin festzustellen, wie sich die Verwendung anderer Verdünnungsmittel (Phosphatpuffer nach SÖRENSEN, Boratpuffer mit CaCl_2 und ohne CaCl_2 , Cagsal (s. später) und Phostio (s. später) oder die Behandlung der Filtrate mit einer 3,8 %igen Natriumzitratlösung und 1-2 g% Trypsin) auf die alpha-Toxinaktivität der 10 A-Stämme auswirkten.

In einer letzten Versuchsreihe wurden Konzentrate von 9 A-Stämmen hergestellt und auf ihre letalen, haemolysierenden und opaleszierenden Eigenschaften bei Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung oder Cagsal als Verdünnungsmittel geprüft, und dann ermittelt, inwieweit die Konzentrate durch Behandlung mit verschiedenen Trypsinmengen in ihren letalen, haemolysierenden und opaleszierenden Eigenschaften beeinflußt wurden.

A Material

Meine Untersuchungen führte ich mit 10 Typ-A-Stämmen des Cl.welchii durch. Folgende Stämme standen mir zur Verfügung:

1. A₁. Dabei handelt es sich um einen Standardstamm (CN 3920) von Burroughs Wellcome & Co., London, der uns 1961 in lyophilisiertem Zustand zugesandt wurde.
2. A₂ (3624). Der Stamm wurde 1967 als Lyophilisat von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, bezogen.
3. A₃ (CA 3488). Der Stamm wurde uns 1970 von Frau I. Batty (Wellcome Reagents Ltd, Beckenham, Kent) überlassen.
4. Stamm 150 wurde im Januar 1967 aus einem Säbelantilopenbock mit Perfringensinfektion isoliert.
5. Stamm 1048 wurde im Institut 1966 aus einer etwa 3 Jahre alten Giraffengazelle, die an einer Perfringensinfektion gestorben war, isoliert.
6. Stamm R₆₀. Dieser wurde 1967 aus einer Erdprobe eines Rentiergeheges, in dem Tiere an Perfringensinfektion erkrankt waren, gewonnen.
7. weizen₃. Der Stamm wurde 1968 aus einer Weizenprobe des Zoologischen Gartens isoliert.

8. St.Pl. (D 776). Der Stamm wurde aus den Organen eines verendeten Saugwelpen gewonnen und im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Krefeld isoliert. Im Dezember 1969 wurde uns dieser Stamm zur Typisierung zugesandt.
9. Kan₂. Dieser Stamm wurde im Sommer 1970 aus dem Darm eines verendeten Kaninchens herausgezüchtet.
10. Ente. Der Stamm wurde im Sommer 1970 aus dem Kot einer Wildente isoliert.

Die Stämme 1048, 158, R₈₀ und Weizen₃ wurden etwa 2 Jahre lang in Leber-Leber-Bouillon unter Paraffinverschluß in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Sie ließen sich nach Überimpfung in frische Nährsubstrate leicht vermehren und konnten nach mehreren Kulturpassagen zur Toxingewinnung benutzt werden. Die Stämme Kan₂ und Ente wurden zunächst typisiert und dann in Leber-Leber-Bouillon bis zur Einbeziehung in die Versuche im Kühlschrank bei +4°C unter Paraffinverschluß aufbewahrt.

B Technik und Methodik

1. Herstellung von Kulturfiltraten

Nach Prüfung auf Reinheit und wiederholter Überimpfung der 10 Stämme von Leber-Leber-Bouillon auf Traubenzuckerblutagarplatten wurden die Stämme auf das von LOGAN und Mitarbeitern (1945) für die Gewinnung des Inokulums empfohlene Substrat überimpft. Es handelt sich bei diesem Nährmedium um eine Caseinhydrolysat-Dextrin-Bouillon, deren Zusammensetzung und Herstellung nach den von LOGAN und Mitarbeitern (1945), FRANKE (1968) und VON SCHMUDE (1971) gegebenen Anweisungen erfolgte.

Das Inokulum wurde mit Leber-Leber-Bouillon gewonnen. 0,5 ml einer 24-stündigen Leber-Leber-Bouillon-Kultur wurden stets zur Beimpfung von 100 ml Logan-Medium verwendet. Die beimpf-

ten Kolben wurden dann in einem evakuierten Exsikkator 6 Stunden bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank bebrütet. Danach wurden die flüssigen Anteile der Kultur abgegossen und 30 Min lang bei ca. 5 000 U/min zentrifugiert, um den Überstand durch Seitzfilter (EK-Filter Gr. 3) zu filtrieren. Soweit eine Aufbewahrung der Filtrate erforderlich war, erfolgte diese in der Tiefkühltruhe bei -20°C .

2. Verdünnungsmittel

a. Boratpuffer

Der Boratpuffer wurde nach BROOKS, STERNE und WARRACK (1957) wie folgt hergestellt:

30 g eines Salzes, bestehend aus:

59 g Borax

84 g Borsäure und

99 g Natriumchlorid

werden in 2 000 ml einer 0,3 %igen NaCl-Lösung gelöst.

b. Phosthio = Phosphat-Thioglykolsäure-Puffer

Dieser Puffer soll nach WILLIS (1969) und BATTY (1970) ein gutes Reduktionsmittel sein, um die alpha-Toxinwirkung auszuschalten und auf ein eventuell zusätzlich vorhandenes Haemolysin zu prüfen. Nach BATTY soll dieser Puffer am Tage der Verwendung stets frisch wie folgt hergestellt werden: Zu 4 ml Aqua dest. gibt man 0,1 ml Thioglykol-Säure. Mit $n/5$ NaOH wird der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Nun wird bis zu 25 ml $1/5$ mol Phosphatpuffer von pH 6,5 aufgefüllt. Herstellung des $1/5$ mol Phosphatpuffers von pH 6,5:

KH_2PO_4	95,32 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	107,46 g
NaCl	50,00 g
H_2O	10,00 l

Einstellen des pH-Wertes.

c. Cagsal = Kalzium-Gelatine-Salzlösung

Von WILLIS (1969) und BATTY (1970) wird als besonders wirksames Verdünnungsmittel für alpha-toxinhaltige Kulturfiltrate eine Kalzium-Gelatine-Salzlösung empfohlen. Diese soll eine ausreichende Ca-Ionenkonzentration enthalten, um eine volle Entfaltung der alpha-Toxin-Aktivität zu ermöglichen. Diese Lösung wird folgendermaßen hergestellt:

138,75 ml einer 1 %igen Kalziumchloridlösung
100,00 ml einer 5 %igen Gelatinelösung
22,50 g NaCl

Man füllt bis zu 2,5 Liter mit Aqua dest. auf.

Es werden hinzugegeben:

0,2 g Thiomersalat
2,5 g Phenol

Nach 10 Minuten langem Autoklavieren bei 1 atü ist diese Lösung längere Zeit haltbar, wenn sie bei +4°C aufbewahrt wird.

3. Trypsinierung

Auch die Wirkung von Trypsin auf die Kulturfiltrate und Kulturfiltratkonzentrate wurde geprüft. Dabei wurde das Trypsinpulver 2 000 E/g (Merck) den Kulturfiltraten und dialysierten Konzentraten der 10 Stämme in 1,0 g%, 1,5 g% und 2 g% zugesetzt. Nach einer Einwirkungszeit von 1 Stunde bei +37°C im Wasserbad wurden Letalitäts-, Hautnekroseteste, Haemolyse- und Lecithovitellinteste durchgeführt.

4. Letalitätstest

Die Letalität wurde an 18-20 g schweren konventionell gezüchteten und gehaltenen Mäusen des NMRI-Stammes durchgeführt. Dabei wurden fallende Filtratmengen intravenös in eine Schwanzvene injiziert. Die Injektionsdosis betrug stets 0,4 ml je Maus. Bei geringeren Filtratmengen wurde mit physiologischer NaCl-Lösung auf 0,4 ml aufgefüllt. Für jede Filtratdosis wurden 4 Mäuse benutzt. Als Dlm wurde die Dosis gewertet, die alle 4 Mäuse innerhalb 24 Stunden tötete.

5. Haemolyse-Röhrchentest

Der Test wurde nach OAKLEY (1943) mit einer 6 %igen Suspension von roten Schafblutkörperchen durchgeführt.

In doppelschlägigen Verdünnungen wurde die Verdünnungsstufe ermittelt, in der noch eine gleichmäßige Rötung des Überstandes zu erkennen war (Dhm). Nach Ansetzen des Testes wurden die Röhrchen 1 Stunde bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad mit zwischenzeitlichem Schütteln aufbewahrt. Es folgte eine weitere Aufbewahrung von 1 Stunde bei Zimmertemperatur und es schloß sich bis zum nächsten Tage eine Aufbewahrung bei $+5^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank an.

6. Haemolyse-Blättchentest

Bezüglich der Technik des Haemolyse-Blättchentestes sei auf die Arbeit von HARTWIGK und CHENITIR (1969) verwiesen. Die Verdünnungen der Kulturfiltrate erfolgten in gleicher Weise wie beim Haemolyse-Röhrchentest.

7. Lecithovitellin-Röhrchentest

Hierbei wurde als Indikator eine Eidotteremulsion benutzt. Nach MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON (1941) wurde das Eidotter eines frischen Hühnereies in 250 ml NaCl-Lösung längere Zeit (ca. 5 Min) geschlagen und die Emulsion 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Danach wurde sie durch ein Seitz-EK-Filter (Filterscheibe Gr. 3) filtriert.

Die Titration wurde in gleicher Weise wie bei dem Haemolyse-Röhrchentest durchgeführt.

Die Ergebnisse des Lecithovitellintestes wurden wie folgt beurteilt:

sehr stark positiv	(++++)	Abscheidung einer dicken Fettschicht und Ausflockung
stark positiv	(+++)	geringe Fettabsonderungen und Flockung
positiv	(++)	starke Trübung (Opaleszenz) ohne Fettabsonderung
schwach positiv	(+)	noch einwandfrei feststellbare Opaleszenz. Dieses Röhrchen galt als Endpunkt = minimale opaleszierende Dosis (Dom)
negativ	(-)	keine Opaleszenz

8. Lecithovitellin-Blättchentest

Dieser Test wurde in ähnlicher Weise wie von SHELDON, MOSKOWITZ und DEVERELL (1959) angegeben mit der Eigelbagarplatte nach WILLIS und HOBBS (1959) durchgeführt. Die mit den doppelschlägigen Kulturfiltratverdünnungen befeuchteten Blättchen wurden auf die Oberfläche des Eigelbnährbodens gelegt. Im positiven Falle kam es nach 24-stündiger Bebrütung im Brutschrank bei $+37^{\circ}\text{C}$ zur Ausbildung eines opaleszierenden Hofes um das Testblättchen.

Zur Herstellung der Eigelbagarplatten wurden gleiche Teile Eigelb und physiologische NaCl-Lösung, die etwa 5 Min mit

Glasperlen in einer Schüttelflasche geschüttelt wurden, in einer Menge von 10 % einem verflüssigten und auf +55°C abgekühlten Nähragar zugegeben, sorgfältig gemischt und in einer Menge von 10 ml je Platte in Petrischalen ausgegossen.

9. Nekrosetest

Für die Nekroseteste wurden konventionell gehaltene adulte Albinomeerschweinchen verwendet. Am Rücken der Meerschweinchen wurden im Bereich beider Lenden die Haare 1 Tag vor Ausführung des Hauttestes mit einer feinen Hurdeschere (Hauptner) möglichst kurz abgeschieden. Danach wurde eine Enthaarungscreme (Pilca) gleichmäßig ca. 3 mm dick aufgetragen. Nach ungefähr 20 Min langer Einwirkungszeit wurden Haare und Creme vorsichtig mit einem Spatel entfernt. Die Haut wurde danach mit lauwarmem Wasser abgespült und trockengetupft.

Von den zu untersuchenden Toxinfiltraten wurden mit steriler NaCl-Lösung doppelschlägige Verdünnungsreihen hergestellt. 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe wurde mittels einer 1 ml Injektionsspritze und einer Kanüle Cro-ni 0,25 x 19 mm intracutan injiziert. Bis zu 7 Injektionen wurden an jeder Rücken- seite ausgeführt, wobei der Abstand zweier Einstichstellen nicht weniger als 1 cm betrug. Als kleinste nekrotische Dosis (Dnm) galt diejenige Verdünnungsstufe, bei der nach spätestens 48 Stunden eine deutliche Nekrose an der Injektionsstelle zu erkennen war.

10. Herstellung der Kulturfiltratkonzentrate

500 ml Logan-Kultur-Filtrat wurde langsam mit 2 Raumteilen einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung versetzt und unter Rühren mit einem Magnetrührer 16 Stunden im Kühlschrank auf-

bewahrt. Danach wurde die trübe bis flockige Flüssigkeit eine halbe Stunde bei 10 000 - 13 000 U/min zentrifugiert und das Sediment nach Dekantieren des Überstandes mit einer 0,02 molaren TRIS-Puffer-Lösung (Hydroxymethyl-aminomethan) aufgelöst. Das Konzentrat wurde so weit mit dieser Tris-Lösung verdünnt, bis sein Volumen 1/10 des Kulturfiltrates betrug. Es folgte das Dialysieren. Die ersten 4 Stunden wurde gegen Tris-Lösung, die folgenden 20 Stunden gegen Aqua dest. (bei einmaligem Wechsel) dialysiert. Während des Dialysiervorganges hielt ein Magnetrührer die Dialysierflüssigkeit in Bewegung. Die Dialysate wurden in 90 mm lange Röhrchen abgefüllt, mit Stopfen versehen und bis zu ihrer Testung in der Tiefkühltruhe aufbewahrt.

C Ergebnisse

Mit folgenden Verdünnungsmitteln wurden die Kulturfiltrate und Kulturfiltratkonzentrate der 10 bzw. 9 Stämme verdünnt:

1. 0,85 %ige NaCl-Lösung (pH 7,0)
2. Phosphatpuffer (pH 6,0; 6,5 und 7,3)
3. Boratpuffer (pH, 8,0)
 - a) mit 0,05 % CaCl_2
 - b) ohne CaCl_2
4. Calcium-Gelatine-Salzlösung =Cagsal
5. Phosphat-Thioglycolsäure-Puffer =Phosthio
6. 3,8 %iges Na-Citrat

1. Mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnte Kulturfiltrate

Die Ergebnisse der Letal-, Hautnekrose-, Haemolyse- und Le-cithovitellinteste sind in Tabelle 1 (Seite 22) zusammengestellt. Alle 10 Stämme verhalten sich in ihrer alpha-Toxin-wirksamkeit verschieden. Als gute Toxinbildner sind die

Tabelle 1: Alpha-Toxin-Wirksamkeit der mit NaCl verdünnten Kulturfiltrate

Stammbe- zeichnung.	Dlm	Dnm	Dhm		Dom	
			Rö	Blä	Rö	Blä
A ₁	0,05	1:8	1:256	1:16	1:128	1:4
A ₂	0,025	1:32	1:512	1:64	1:512	1:4
A ₃	0,3	unver dünnt	1:4	1:4	1:16	1:16
1048	0,2	unver dünnt	1:256	1:2	1:32	-
St.Pl.	0,1	1:8	1:128	1:4	1:128	-
Weizen ₃	0,05	1:8	1:64	1:32	1:256	1:4
R ₈₀	0,1	1:2	1:256	1:16	1:256	1:8
15c	0,1	1:4	1:32	1:2	1:64	1:2
Kan ₂	0,3	1:4	1:128	1:16	1:256	1:4
Ente	0,025	1:8	1:128	1:32	1:256	1:4

Dlm = kleinste letale Dosis

Dnm = kleinste nekrotische Dosis

Dhm = kleinste haemolytische Dosis

Dom = kleinste opaleszierende Dosis

Rö = Röhrchentest

Blä = Blättchentest

- = keine Aktivität sichtbar

unverd. = nur unverdünntes Kulturfiltrat wirksam

Stämme A_2 und Ente zu beurteilen. Ihre haemolytischen und opaleszierenden Eigenschaften laufen parallel. Der am wenigsten alpha-Toxin bildende Stamm ist der Stamm A_3 . Die Stämme A_1 und Weizen₃ sind mittelmäßige Toxinbildner, während die Stämme 1048, St.Pl., R_{80} , 158 und Kan_2 den vorgenannten Stämmen in ihrer Fähigkeit, wirksames alpha-Toxin zu bilden, gering unterlegen sind.

Eine gewisse Parallelität ist bei den Ergebnissen der 6 Teste an den 10 Stämmen schon vorhanden. Aber in einzelnen Fällen sind Letalität, Haemolyse- und Opaleszenz-Aktivität nicht unbedingt gekoppelt. Das gilt insbesondere für die Stämme R_{80} und Kan_2 , die eine geringe Letalität zeigen, aber relativ hohe Haemolyse- und LV-Titer aufweisen.

2. Mit verschiedenen Pufferlösungen verdünnte Kulturfiltrate

a. Phosphatpuffer

Als nächstes wurde Phosphatpuffer nach Sørensen (HALLMANN, 1953) mit einem pH-Wert von 7,3 als Verdünnungsmittel für die Kulturfiltrate benutzt und seine Wirkung auf die haemolytische und opaleszierende Aktivität festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 (Seite 24) zusammengefaßt. Von der Durchführung des Letal- und Hautnekrosetestes wurde abgesehen.

Phosphatpuffer bewirkt als Verdünnungsmittel bei schwachen Toxinbildnern (A_3 und 158) eine Reduktion der haemolytischen Aktivität und verringert bei allen Stämmen die opaleszierende Eigenschaft stärker als die haemolysierende Eigenschaft. Starke und mäßig starke Toxinbildner wie die Stämme A_2 , A_1 , 1048 und St.Pl. werden jedoch in der haemolytischen Aktivität ihres alpha-Toxins nur geringgradig durch die Pufferlösung beeinflusst. Wurde die Pufferlösung auf pH 6,5 und 6,0 eingestellt, ergaben sich in den reduzierenden Wirkungen keine erheblichen Unterschiede.

Tabelle 2: Endtiter der mit Phosphatpuffer nach Sörensen (pH 7,3) verdünnten Kulturfiltrate

Stammbe- zeichng.	Dhm		Dom	
	Rö	Blä	Rö	Blä
A ₁	1:128	1:16	1:32	1:4
A ₂	1:256	1:32	1:64	1:4
A ₃	1:2	-	1:4	-
1048	1:256	1:2	1:8	-
St.Pl.	1:128	1:4	1:32	-
Weizen ₃	1:8	1:8	1:16	1:2
R ₈₀	1:128	1:8	1:32	1:4
158	1:8	-	1:32	1:2
kan ₂	1:32	1:8	1:64	1:4
Ente	1:8	1:16	1:16	1:2

Der Versuch zeigt, daß Phosphatpuffer das alpha-Toxin nur bei einzelnen Stämmen reduziert, aber bei keinem Stamm völlig unwirksam macht.

b) Boratpuffer pH 8,0 mit 0,05 % CaCl_2 -Zusatz

Die Prüfungen der mit Boratpuffer + 0,05 % CaCl_2 hergestellten Kulturfiltratverdünnungen im Haemolyse- und LV-Test hatten folgendes Ergebnis (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Endtiter der mit Boratpuffer (pH 8,0) + 0,05% CaCl_2 verdünnten Kulturfiltrate

Stammbezeichnung.	Dhm		Dom	
	Rö	Blä	Rö	Blä
A ₁	1:256	1:32	1:256	1:4
A ₂	1:512	1:64	1:1024	1:8
A ₃	1:32	1:8	1:64	1:8
1048	1:256	1:2	1:256	-
St.Pl.	1:256	1:16	1:512	-
Weizen ₃	1:256	1:64	1:512	1:8
R ₈₀	1:256	1:32	1:512	1:16
158	1:256	1:32	1:256	1:8
Kan ₂	1:256	1:32	1:512	1:16
Ente	1:256	1:64	1:512	1:16

Bei den Stämmen A₁, A₂, 1048 und R₈₀ ist die alpha-Toxinwirksamkeit bei der Haemolyse gleichgeblieben in Bezug auf die Werte in Tabelle 1. Bei dem Stamm A₃ tritt eine Steigerung nicht hervor, bei 5 Stämmen ist eine geringe Steigerung erkennbar. Bemerkenswert ist, daß die Endtiter im Opaleszenztest, abgesehen von den Stämmen A₃, A₁ und 1048, bei 7 Stämmen erhöht sind.

c) Boratpuffer pH 8,0 ohne CaCl_2 -Zusatz

In Tabelle 4 sind die haemolytischen und opaleszierenden Endtiter der 10 Kulturfiltrate eingetragen. Die Titer weichen nicht erheblich von denen ab, die bei Verdünnung mit Phosphatpuffern erzielt wurden. Eine Steigerung der alpha-Toxinwirkung liess sich mit Boratpuffer ohne CaCl_2 nicht erreichen.

Tabelle 4: Endtiter der mit Boratpuffer (pH 8,0) ohne CaCl_2 -Zusatz behandelten Kulturfiltrate

Stammbe- zeichng.	Dhm		Dom	
	Rö	Blä	Rö	Blä
A ₁	1:64	1:16	1:64	1:4
A ₂	1:128	1:8	1:64	1:4
A ₃	1:2	-	1:2	-
1048	1:256	1:2	1:4	-
St.Pl.	1:64	1:4	1:16	-
Weizen ₃	1:16	1:8	1:32	1:2
R ₈₀	1:32	1:8	1:16	1:2
158	1:8	-	1:16	-
Kan ₂	1:32	1:2	1:64	1:4
Ente	1:16	1:16	1:32	1:4

3. Mit "Cagsal und Phosthio" verdünnte Kulturfiltrate

Die Ergebnisse, die bei den 10 Kulturfiltraten erzielt wurden, sind aus Tabelle 5 ersichtlich. Eine deutliche Steigerung der Toxinaktivität gegenüber den Werten in Tabelle 1 zeigt sich sowohl im Haemolyse-Röhrchentest als auch im LV-Röhrchentest. Hervorzuheben ist, daß der schwache Toxinbildner A₃ mit Cagsal als Verdünnungsmittel einen relativ hohen haemolytischen Endtiter (1:128) erzielt. Der opaleszierende Endtiter beträgt 1:256. Bei 7 Stämmen liegen die haemolytischen Endtiter höher als sie von Kulturfiltraten mit Boratpuffer + CaCl₂ erreicht wurden. Auch die Endtiter im LV-Test liegen in den meisten Fällen über denen mit Boratpuffer + CaCl₂.

Tabelle 5: Endtiter der mit Cagsal und Phosthio verdünnten Kulturfiltrate

Stammbe- zeichng.	Cagsal		Phosthio	
	Dhm Rö	Dom Rö	Dhm Rö	Dom Rö
A ₁	1:512	1:1024	1:64	1:32
A ₂	1:2048	1:2048	1:128	1:64
A ₃	1:128	1:256	-	-
1048	1:256	1:256	1:64	1:8
St.Pl.	1:256	1:256	1:64	1:32
Weizen ₃	1:1024	1:1024	1:8	1:8
R ₈₀	1:512	1:1024	1:128	1:32
158	1:512	1:512	1:32	1:8
Kan ₂	1:256	1:512	1:64	1:64
Ente	1:1024	1:2048	1:64	1:64

Die mit Phosthio verdünnten Kulturfiltrate sind in ihren Endtitern stark erniedrigt. Einige Stämme zeigen durch Phosthio einen etwas stärkeren Rückgang ihrer Aktivität als andere. Eine vollständige Inaktivierung war bei A₃ festzustellen.

4. Mit 3,8 %iger Na-Citrat-Lösung verdünnte Kulturfiltrate

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: Endtiter der mit 3,8 %igen Natriumcitrat-Lösung verdünnten Kulturfiltrate

Stammbe- zeichnung.	Dhm		Dom	
	Rö	Blä	Rö	Blä
A ₁	1:64	1:8	1:8	1:4
A ₂	1:256	1:16	1:16	1:2
A ₃	-	-	-	-
1048	1:128	-	1:8	-
St.Pl.	1:128	1:4	1:16	-
Weizen ₃	1:4	1:4	1:16	-
R ₈₀	1:32	1:4	1:16	1:2
158	1:2	-	1:2	-
Kan ₂	1:16	-	1:8	1:2
Ente	1:16	1:4	1:4	1:2

Die haemolytische Aktivität ist bei 7 Stämmen (A₁, A₃, Weizen₃, R₈₀, 158, Kan₂ und Ente) gegenüber den Werten in Tabelle 1 verringert. Bei 3 Stämmen (A₂, 1048 und St.Pl.) ist die

haemolytische Aktivität gleichgeblieben oder um eine Stufe gesunken. Bei A_3 ist sie völlig unterdrückt.

Die opaleszierende Aktivität zeigt bei allen Stämmen eine erhebliche Reduktion. Bei dem Stamm A_3 ist keine Wirksamkeit gegenüber Eidotteremulsion mehr festzustellen.

5. Mit Trypsin behandelte Kulturfiltrate

Den Kulturfiltraten wurde Trypsinpulver in einer Menge von 1 g%, 1,5 g% und 2 g% zugesetzt. Nach 1 stündiger Einwirkung im Wasserbad wurden Verdünnungsreihen mit physiologischer NaCl-Lösung hergestellt und die letale, hautnekrotische, haemolysierende Eigenschaft festgestellt. Die Endtiter sind in Tabelle 7 (Seite 30) aufgeführt. Bei allen 10 untersuchten Kulturfiltraten wurde durch die Trypsinbehandlung entweder eine völlige Ausschaltung oder eine starke Verringerung der letalen Wirkung erreicht. Nur Filtratmengen von 0,4 ml und 0,2 ml wirkten noch letal, und zwar bei den Stämmen A_1 , A_2 , St.Pl., Weizen₃ und R_{80} . In einzelnen Fällen (A_1 und Weizen₃) wirkten die höheren Trypsinmengen stärker reduzierend als die niedrigeren.

Die hautnekrotisierende Eigenschaft der Kulturfiltrate ist durch das Trypsin weitgehend unterdrückt und bei 7 Stämmen (A_3 , 1048, St.Pl., Weizen₃, 158, Kan₂ und Ente) nicht mehr vorhanden.

Die haemolysierende Wirkung ist stark reduziert und bei 3 Stämmen (A_3 , Weizen₃ und 158) völlig geschwunden. Bei 7 Stämmen wirken 1,5 g% und 2 g% Trypsin stärker reduzierend als 1 g%. Gleiches gilt für die opaleszierende Eigenschaft, obwohl die Opaleszenztiter bei 4 Stämmen (A_1 , A_2 , St.Pl., R_{80}) höher sind als die haemolytischen Titer.

Tabelle 7: Endtiter der mit Trypsin behandelten Kulturfiltrate

Stammbe- zeichnung.	g%Tr.	Dlm	Dnm	Dhm		Dom	
				Rö	Bl	Rö	Bl
A ₁	1	0,4	1:4	1:16	1:4	1:64	-
	1,5	0,2	-	1:8	1:2	1:64	-
	2	0,2	-	1:4	-	1:32	-
A ₂	1	0,4	1:8	1:128	1:8	1:128	-
	1,5	0,4	-	1:64	1:8	1:64	-
	2	0,4	-	1:64	1:4	1:64	-
A ₃	1	-	-	-	-	-	-
	1,5	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
1048	1	-	-	1:2	-	1:2	-
	1,5	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
St.Fl.	1	0,4	-	1:8	1:2	1:32	-
	1,5	0,4	-	1:8	1:2	1:4	-
	2	0,4	-	1:4	1:2	-	-
Weizen ₃	1	0,4	-	-	-	-	-
	1,5	0,4	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
R ₈₀	1	0,4	unv	1:8	-	1:16	-
	1,5	0,4	-	1:8	-	1:4	-
	2	0,4	-	-	-	1:2	-
158	1	-	-	-	-	-	-
	1,5	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
kan ₂	1	-	-	1:4	-	1:4	-
	1,5	-	-	1:2	-	1:2	-
	2	-	-	-	-	-	-
Ante	1	-	-	1:2	-	1:2	-
	1,5	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-

g%Tr. = g% Trypsin im Kulturfiltrat

unv. = Aktivität nur bei unverdünntem Filtrat erkennbar

- = keine Aktivität festzustellen

6. Wirksamkeit dialysierter Konzentrate bei NaCl- und Cagsal-Verdünnung

Dialysierte Kulturfiltratkonzentrate von 9 Stämmen wurden mit physiologischer NaCl-Lösung und Cagsal verdünnt und im Haemolyse- und LV-Test geprüft. Zur Kontrolle ihrer Dlm wurden sie unter Verwendung von physiologischer NaCl-Lösung als Verdünnungsmittel im Mäuseletaltest getestet. Die Ergebnisse siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Endtiter der mit NaCl und Cagsal verdünnten dialysierten Kulturfiltrat-Konzentrate

Stammbe- zeichnung.	Dlm	Dhm		Dom	
		NaCl	Cagsal	NaCl	Cagsal
A ₁	0,0125	1:2048	1:4096	1:64	1:2048
A ₂	0,002	1:1024	1:16384	1:1024	1:16384
A ₃	0,1	1:16	1:2048	1:128	1:512
1048	0,05	1:128	1:1024	1:128	1:512
St.Pl.	0,025	1:8	1:1024	1:16	1:2048
Weizen ₃	0,0125	1:8	1:1024	1:16	1:1024
R ₈₀	0,025	1:4	1:1024	1:16	1:2048
158	0,0125	1:32	1:4096	1:512	1:4096
Kan ₂	0,5	1:32	1:2048	1:64	1:2048

In der Dlm erweist sich wieder der Stamm A₃ als schwacher Toxinbildner. Bei den anderen 8 Stämmen reicht die Dlm von

0,002 (A_2) bis 0,05 (1048, Kan₂). Im Haemolysetest erzielen 3 Stämme (A_1 , A_2 , 1048) bei NaCl-Verdünnung noch relativ hohe Endtiter, bei 6 Stämmen sind die Endtiter gering.

Beim LV-Test sind 4 Stämme (A_2 , A_3 , 1048, 158) in ihren Endtitern relativ hoch. Cagsal als Verdünnungsmittel steigert die haemolytische und opaleszierende Eigenschaft bei allen 9 Stämmen erheblich.

7. Wirksamkeit dialysierter Kulturfiltratkonzentrate bei Trypsinierung

Die dialysierten Kulturfiltratkonzentrate wurden trypsiniert und unter Verwendung von NaCl-Verdünnung in ihrer Dlm bestimmt. Die trypsinierten Kulturfiltratkonzentrate wurden dann mit physiologischer NaCl oder Cagsal verdünnt und ihre haemolytische Eigenschaft geprüft. Die opaleszierende Eigenschaft wurde nur mit NaCl als Verdünnungsmittel geprüft. Die Ergebnisse siehe Tabelle 9 (Seite 33).

Bei 4 Stämmen (A_1 , A_3 , St.Pl., Kan₂) war eine letale Eigenschaft nicht mehr vorhanden, bei 5 Stämmen war diese im Vergleich zu den Konzentraten ohne Trypsinbehandlung stark gesunken.

Die haemolytische Aktivität war bei 4 Stämmen völlig geschwunden. Wurde Cagsal als Verdünnungsmittel der trypsinierten Konzentrate verwendet, so war bei 4 Stämmen eine geringgradige Steigerung der haemolytischen Aktivität gegenüber den mit NaCl verdünnten trypsinierten Konzentraten festzustellen.

Bei 3 Stämmen zeigte sich noch eine geringe opaleszierende Aktivität, bei den übrigen Stämmen war sie nicht mehr vorhanden.

Tabelle 9: Endtiter dialysierter Kulturfiltrat-Konzentrate nach Trypsinbehandlung

Stammbe- zeichnung.	g%Tr.	Dlm	Dhm		Dom NaCl
			NaCl	Cagsal	
A ₁	1	-	-	-	-
	1,5	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
A ₂	1	0,4	1:4	1:16	1:32
	1,5	0,4	1:4	1:16	1:32
	2	0,4	1:4	1:16	1:32
A ₃	1	-	1:2	-	1:16
	1,5	-	1:2	-	-
	2	-	1:2	-	-
1048	1	0,4	-	1:2	-
	1,5	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
St.Pl.	1	-	1:2	1:16	1:16
	1,5	-	1:2	1:16	1:16
	2	-	1:2	1:8	1:16
Weizen ₃	1	0,4	-	-	-
	1,5	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
R ₈₀	1	0,4	1:2	1:32	-
	1,5	0,4	1:2	1:32	-
	2	-	1:2	1:16	-
158	1	0,4	1:2	-	-
	1,5	0,4	-	-	-
	2	-	-	-	-
Kan ₂	1	-	-	-	-
	1,5	-	-	-	-
	2	-	-	-	-

g%Tr. = Trypsin im Kulturfiltrat

- = keine Aktivität festzustellen

B e s p r e c h u n g

Mit 10 A-Stämmen des *Cl.welchii* wurden Kulturfiltrate und mit 9 A-Stämmen Kulturfiltratkonzentrate gewonnen, um diese auf Verringerung oder Steigerung der alpha-Toxineigenschaften bei Verwendung von Verdünnungsmitteln zu prüfen, die nach Angaben der Literatur sich mindernd (Phosphatpuffer, Na-Citrat, Phosthio) oder steigernd (Boratpuffer + 0,05 % CaCl_2 , Boratpuffer ohne CaCl_2 , Cagsal) auf das alpha-Toxin auswirken.

In einer besonderen Versuchsreihe wurden Filtrate und Konzentrate mit 1,0 g%, 1,5 g% und 2,0 g% Trypsin behandelt, um sie dann mit physiologischer NaCl-Lösung zu verdünnen und im Letal-, Haemolyse- und Lecithovitellintest auf Wirksamkeit des alpha-Toxins zu untersuchen.

Das Trypsin spielt bei der Differenzierung der 4 Major-Toxine mit dem Neutralisationstest eine besondere Rolle, weil es durch Umwandlung der Protoxine des epsilon- und jota-Toxins in fertige Toxine die Wirksamkeit beider Toxine erhöht, die Wirksamkeit des alpha-Toxins aber vermindert und daher die Möglichkeit bietet, durch Typ-Antiseren die 4 Major-Toxine (alpha-, beta-, epsilon- und jota-Toxin) besser voneinander zu unterscheiden. Dies ist besonders wichtig, weil alle 4 Toxine letal auf Mäuse und nekrotisierend auf Meerschweinchenhaut wirken.

Bei Vermehrung der Keime des Types A von *Cl.welchii* in für die Toxinbildung geeigneten Nährmedien wird außer alpha-Toxin auch theta-Toxin produziert. Beide Toxinarten wirken auf rote Blutkörperchen haemolysierend, und sie sind deshalb durch den Haemolysetest nicht leicht voneinander zu unterscheiden.

Nach TODD (1941) ist das theta-Toxin im Gegensatz zum alpha-Toxin oxygenlabil. Es soll bei Verwendung von Tiefenfiltern, mit denen ich meine Filtrate herstellte, nicht mehr in diesen enthalten sein (VAN HEYNINGEN, 1941). Fleisch- oder Herzmuskelstückchen fördern die alpha-Toxinbildung, absorbieren aber das theta-Toxin (BROOKS, STERNE und WARRACK, 1957). Das von mir benutzte Logansubstrat enthielt Herzmuskelstückchen und dürfte daher die Entstehung von theta-Toxin kaum zulassen.

Das alpha-Toxin ruft als Lecithinase (MACFARLANE, OAKLEY und ANDERSON, 1941) die Opaleszenz in Eigelbsuspension hervor.

Das theta-Toxin ist jedoch im LV-Test unwirksam. Da bei meinen Titrierungen die Endtiter im LV-Test und im Haemolysetest eine weitgehende Parallelität aufwiesen, kann wohl angenommen werden, daß in den von mir untersuchten Filtraten und Konzentraten in der Hauptsache alpha-Toxin enthalten war. Diese Annahme wird noch durch die folgende Ausführung bekräftigt:

Nach OAKLEY und WARRACK (1941) macht ein Zusatz von 0,5 % CaCl_2 zu Pferdeblutagar die Erythrozyten teilweise gegen alpha-Toxin empfindlich. Um die auf diesen Platten gewachsenen Kolonien entsteht bei einer alpha-Toxinproduktion der Keime eine breite Zone partieller Haemolyse (alpha-Haemolyse). Stämme, die zusätzlich theta-Toxin produzieren, bilden außerdem eine Zone vollständiger Haemolyse (beta-Haemolyse). EVANS (1945a) machte die gleiche Feststellung. Alle in meiner Arbeit benutzten Typ A-Stämme zeigten auf Pferdeblutagarplatten mit 0,5 % CaCl_2 -Zusatz um ihre gewachsenen Kolonien einen Hof vollständiger Haemolyse und einen Hof partieller Haemolyse. Wurden Testblättchen mit den Kulturfiltraten der 10 Stämme befeuchtet und auf Pferdeblutagarplatten mit 0,5 % CaCl_2 gelegt, dann bildete sich nach 24-stündiger Inkubierung bei $+37^\circ\text{C}$ im Brutschrank und anschlies-

sender 24-stündiger Aufbewahrung im Kühlschrank um alle Testblättchen ein Hof partieller Haemolyse. Aus den zwei Haemolysearten auf Pferdeblutagarplatten um die gewachsenen Kolonien kann geschlossen werden, daß von den 10 benutzten Typ A-Stämmen alpha- und theta-Toxin gebildet wurden. Der Testblättchenversuch mit Kulturfiltraten läßt hingegen die Vermutung zu, daß in den Filtraten nur noch das alpha-Toxin wirksam war, denn es zeigte sich um die filtratgetränkten Testblättchen nur noch eine partielle Haemolyse. Es ist sehr wahrscheinlich, daß nach Art der Gewinnung der Kulturfiltrate das oxygenlabile theta-Toxin unwirksam geworden war.

Um diese Feststellung noch zu untermauern, habe ich mit einem Haemolyse-Neutralisationstest stichprobenweise an 2 A-Stämmen (A₁, A₂) geprüft, ob in den beiden konzentrierten Kulturfiltraten Mäuseletalität, haemolytische, Lecithovitellin- und Hautnekrose-Aktivität auf das Vorliegen von alpha-Toxin zurückzuführen waren. Die Endpunkte der Toxinaktivität beider Konzentrate wurden im einfachen Haemolyse-Röhrchentest bestimmt. Mit einem monospezifischen A-Antiserum, das 220 Anti-alpha-Toxin-Einheiten/ml enthielt und das mir in großzügiger Weise von Frau I. Batty, London, zur Verfügung gestellt worden war, wofür ich ihr sehr danken möchte, wurde der Test in der Weise vorgenommen, daß 0,25 ml Antiserum in einer Verdünnung von 1:30 mit einer gleichen Menge Konzentrat in den Verdünnungen 1:2 bis 1:1024 (Stamm A₁) bzw. bis 1:4096 (Stamm A₂) gemischt und 1 Stunde im Wasserbad aufbewahrt wurden. Die Toxin-Endstufen entsprechen der 4fachen haemolytischen Dosis. Schließlich wurden 0,5 ml 6 %ige Schaferythrozytensuspension in jedes Röhrchen pipettiert, die Mischung gut durchgeschüttelt und für 1 Stunde mit zwischenzeitlichem nochmaligem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Nach Herausnahme des Gestelles aus dem Wasserbad

wurden die Röhrchen über Nacht im Kühlschrank (+5°C) aufbewahrt und das Ergebnis abgelesen. Es ergab sich, daß das Antiserum, das bei der Verdünnung 1:30 7,3 Anti-alpha-Einheiten/ml enthielt, nicht nur die 4fache, sondern sogar die 16fache haemolysierende Dosis beider Kulturfiltratkonzentrate neutralisierte. Die relativ starke Bindungskraft zwischen Toxin und Antitoxin wird von mir dahingehend gedeutet, daß in beiden Konzentraten überwiegend alpha-Toxin enthalten war.

Von den geprüften Verdünnungsflüssigkeiten wirkten die Phosthio-Lösung und die 3,8 %ige Na-Citrat-Lösung am stärksten alpha-toxinreduzierend. Bei manchen Stämmen wurde die Toxinaktivität durch Phosthio stärker reduziert, andere Stämme wiederum wurden durch Na-Citrat stärker reduziert. Bei schwachen Toxinbildnern hoben beide die toxische Wirkung auf. Sowohl Phosthio als auch Na-Citrat waren nicht imstande, das gleiche bei guten Toxinbildnern zu tun. Die günstigen Ergebnisse mit Phosthio bestätigen die Erfahrungen, die BROOKS, STERNE und WARRACK (1957), WILLIS (1969) und BATTY (1970) mit dieser Lösung als Verdünnungsflüssigkeit bei der Differenzierung der 5 Typen des Cl. welchii mit der Neutralisation im Haemolysetest erzielt haben.

Die Phosphatpufferlösung ließ auch eine reduzierende Wirkung auf das alpha-Toxin in den Kulturfiltraten der 10 Stämme erkennen. Sie war aber geringer, als bei der Phosthio-Lösung und Na-Citrat-Lösung.

1 g% Trypsin reduziert die alpha-Toxineigenschaft am stärksten. Dies gilt sowohl für die Toxizität bei der Maus als auch für die hautnekrotisierende Wirkung beim Meerschweinchen und für die haemolysierende und opaleszierende Eigenschaft des alpha-Toxins. Eine Erhöhung der Trypsinmenge auf 1,5 g% und 2,0 g% reduziert das alpha-Toxin stärker als 1,0 g% Trypsin. Doch vermag das Trypsin nicht bei guten

Toxinbildnern und hohen Toxinkonzentrationen die alpha-Toxinwirksamkeit völlig zu unterdrücken.

Die von WILLIS und BATTY gegebenen Empfehlungen, den Neutralisationstest mit trypsinierten und nicht-trypsinierten Kulturfiltraten durchzuführen, bedeuten einen erheblichen Fortschritt für die Differenzierung der 5 Major-Toxine, und zwar nicht nur im Hinblick auf die Umwandlung der Protoxine des epsilon- und jota-Toxins in wirksames Toxin, sondern auch im Hinblick auf die erhebliche Reduktion der letalen oder hautnekrotisierenden Wirkung des alpha-Toxins.

Von den Verdünnungsflüssigkeiten, die die alpha-Toxinaktivität steigern, ist die Cagsal-Lösung bei weitem die wirksamste. Sie übertrifft den Boratpuffer mit 0,05 % CaCl_2 , der in der Literatur (OAKLEY und WARRACK, 1941; HINZ, 1964) im Zusammenhang mit einer Steigerung der haemolytischen Aktivität wiederholt erwähnt worden ist.

Wenig befriedigend waren die Ergebnisse mit Boratpuffer ohne CaCl_2 . Gegenüber NaCl-Lösung als Verdünnungsmittel war keine Steigerung der Haemolyse und der Opaleszenz festzustellen, sondern eine Minderung, die fast die reduzierende Wirkung von Phosthio und Na-Citrat erreichte.

Die Kalziumsalze sind, wie oft in der Literatur betont worden ist (OAKLEY, WILLIS, MASON, SMITH und GARDNER), für die Aktivität des alpha-Toxins ausschlaggebend. Dies tritt besonders bei der Titrierung von dialysierten Konzentraten im Haemolysetest hervor, bei denen in den meisten Fällen die Endtiter bei NaCl-Verdünnung weit niedriger sind als die Endtiter roher Kulturfiltrate. Diese Feststellung deckt sich weitgehend mit den von PENFOLD (1941) durchgeführten Untersuchungen. Dagegen sind die Endtiter der dialysierten Konzentrate bei Cagsal-Verdünnung besonders hoch.

Es war nicht möglich, mit den von mir geprüften Mitteln das alpha-Toxin bei guten Toxinbildnern völlig auszuschalten. Ob dieses Ziel mit den in der Literatur sonst noch genannten Mitteln, wie Oxalat, Na-Fluorid, K-Cyanid, Thio-glycollsäure, Hydrogensulfid u.a. zu erzielen ist, müßte in weiteren Versuchen untersucht werden.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Die Schwierigkeit, bei A-Stämmen des Cl. welchii das alpha-Toxin vom theta-Toxin zu trennen, gab Anlaß zu prüfen, inwieweit das alpha-Toxin durch Trypsinbehandlung, Phosthio-Lösung und Phosphatpuffer-Lösung in Kulturfiltraten und Kulturfiltratdialysaten bis zur Unwirksamkeit reduziert werden konnte. Die Prüfung auf alpha-Toxin wurde mittels Mäuseletal-, Haemolyse-, Lecithovitellin- und Hautnekrose-Test vorgenommen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Eine Trypsinbehandlung mindert die Aktivität des alpha-Toxins bei Kulturfiltraten und Kulturfiltratkonzentraten am stärksten von allen geprüften Mitteln. Diese Minderung der Toxinaktivität zeigt sich auch im Letaltest an der Maus und im Hautnekrosetest am Meerschweinchen. Bei schwachen alpha-Toxinbildnern wird das Toxin durch Trypsinbehandlung unwirksam, bei starken alpha-Toxinbildnern bleibt jedoch ein Rest von alpha-Toxin in wirksamer Form erhalten.
2. Von den geprüften Verdünnungsmitteln für Kulturfiltrate und Kulturfiltratkonzentrate erwies sich in der Reduktion des alpha-Toxins die Phosthio-Lösung und in etwas schwächerem Maße die Na-Citrat-Lösung am wirksamsten. Es gelang damit bei schwachen Toxinbildnern das alpha-Toxin völlig auszuschalten, und bei starken Toxinbildnern ließ sich die Wirksamkeit des alpha-Toxins nur reduzieren.
3. Ungünstig in bezug auf die Reduktion der alpha-Toxinwirkung zeigte sich eine Verdünnung mit Phosphatpuffer-Lösung nach Sörensen. Selbst bei schwachen Toxinbildnern konnte die Toxinaktivität mit der Phosphatpuffer-Lösung nicht völlig ausgeschaltet werden.

4. Eine Steigerung der alpha-Toxinwirkung konnte bei allen geprüften Stämmen am stärksten durch die Cagsal-Lösung erzielt werden. Boratpuffer mit einem Zusatz von 0,05 % CaCl_2 war in der Hinsicht der Cagsal-Lösung unterlegen, während Boratpuffer ohne CaCl_2 keine steigernde Wirkung hatte.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- Al-Khatib, G.: Untersuchungen über haemolysierende und haemagglutinierende Eigenschaften der pathogenen Anaerobier, geprüft an Erythrocyten des Menschen und der meisten Haustierarten.
Mh. Vet.Med., 21, 803 (1964)
- Báttý, I.: Routine typing of *Clostridium welchii* (perfringens). Burroughs, Wellcome & Co, Informationsblatt, London (1970)
- Brooks, M.E.; Sterne, M. und Warrack, G.H.:
A re-assessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*
J. Path. Bact. 74, 185 (1957)
- Burrow, W.: Textbook of microbiology
W.B. Saunders, Philadelphia and London (1959)
- Elder, J.M. und Miles, A.A.: The action of the letal toxins of gas gangrene clostridia on capillary permeability
J. Path. Bact. 74, 133 (1957)
- Evans, D.G.: Anticollagenase in immunity to *Cl.welchii* type A infection
Brit. J. Exper. Path. 28, 24 (1947)
- The in-vitro production of alpha-toxin, theta-haemolysin and hyaluronidase by strains of *Cl.welchii* type A, and the relationship of in-vitro properties to virulence in guinea pigs.
J. Path. Bact. 57, 75 (1945)
- The protective properties of the alpha-antihaemolysin occurring in *Cl.welchii* type A antiserum.
Brit. J. Exper. Path. 24, 81 (1943)
- Franke, F.: Intracutantest mit Toxinfiltraten von *Cl.welchii* an immunisierten Meerschweinchen unter besonderer Berücksichtigung der Typendifferenzierung.
Vet. med. Diss., Berlin FU (1968)

- Glenny- A.T.; Llewellyn-Jones, M., Mason, J.H.:
The intracutaneous method of testing the
toxins and antitoxins of the "gangrene"
organisms.
J. Path. Bact., 34, 201 (1931)
- Goeva u. Mitarbeiter: Untersuchung der löslichen Antigene
von Stämmen von *Cl. perfringens*, die aus dem
Stuhl gesunder Menschen isoliert wurden
=Russ.= Z. mikrobiol. (Moskva) 5, 45, 42
(1968)
zitiert in Köhler und Baumgart: 1970
- Hallmann, L.: Bakteriologische Nährböden
G.Thieme Verl., Stuttgart (1953)
- Hartwigk, H. und Chenitir, H.: Nachweis des alpha-Toxins von
Cl. welchii mit Testblättchen
Zbl. Vet. Med. Reihe B 16, 266 (1969)
- Hobbs, B.C.; Smith, M.E.; Oakley, C.C.; Warrack, G.H. und
Cruickshank, J.C.:
Cl. welchii food poisoning
J. Hyg. 51, 75 (1953)
- Kielley, W.W. und Meyerhof, O.: Studies on adenosinetriphos-
phatase of muscle.
II. A new magnesium-activated adenosine-
triphosphatase.
J. Biol. Chem. 176, 591 (1948)

Studies on adenosinetriphosphatase of muscle.
III. The lipoprotein nature of the magnesium-
activated adenosinetriphosphatase.
J. Biol. Chem., 183, 391 (1950)
- Klose, F.: Toxin-Antitoxinstudien mit dem Fraenkel'schen
Gasbacillus
Münch. med. Wschr., 63, 723 (1916)
- Köhler, B. und Baumgart, W.: Toxin-Infektionen durch *Clostridium*
perfringens Typ A bei Greifvögeln.
Mh. Vet. Med. 25, 348 (1970)
- Lenkov u. Mitarbeiter: Diagnostik der durch *Cl. perfringens*
verursachten Enterotoxämie bei Kälbern
=Russ.=
Veterinarija 42, 4, 30 (1966)
zitiert in Köhler und Baumgart: 1970
- Logan, M.A. und Mitarbeiter: Produktion of *Cl. welchii* alpha-
toxin, J. Immunol. 51, 317 (1945)

- Long, C. und Maguire, M.F.: Evidence for the structure of ovolécithin derived from a study of the action of lecithinase C.
Biochem. J. 55, Proc. xv (1953)
- Mac Clean, D.: Studies on diffusing factors.
2. Methods of assay of hyaluronidase and their correlation skin diffusing activity.
Biochem. J. 37, 169 (1943)
- Macfarlane, R.G.; Oakley, CL. und Anderson, C.G.:
Haemolysins and the production of opalescence in serum and lecithovitellin by alpha-toxin of Cl.welchii.
J. Path. Bact. 52, 99 (1941)
- Macfarlane, M.G. und Knight, B.C.J.G.:
1. The lecithinase activity of clostridium welchii toxins.
Biochem. J. 35, 884 (1941)
- Macfarlane, M.G.: The specificity of the lecithinase present in Cl.welchii toxin
Biochem. J., 36, Proc. iii (1942)
- The biochemistry of bacterial toxins.
2. The enzymic specificity of Clostridium welchii lecithinase.
Biochem. J. 42, 587 (1948a)
- The biochemistry of bacterial toxins.
5. Variation in haemolytic activity of immunologically distinct lecithinases towards erythrocytes from different species.
Biochem. J. 47, 270 (1950)
- Matthes, S.: Untersuchungen über die Dermotoxine der 6 Clostridium-Welchii-Typen am Kaninchen.
Zbl. Bakt. I. Org. 196, 508 (1965)
- Oakley, C.L. und Warrack, G.H.: Factors effecting the activity of the alpha-toxin of cl.welchii.
J. Path. Bact. 53, 335 (1941)
- Oakley, C.L.: The toxins of Clostridium welchii.
Bull. Hyg. 18, 781 (1943)
- Oakley, C.L. und Warrack, G.H.: Routine typing of Cl.welchii.
J. Hyg. 51, 102 (1953)
- Penfold, W.J. und Mitarbeiter: Active immunisation against gas gangrene and tetanus.
J. Path. Bact. 52, 187 (1941)

- Roberts, R.S.: In: Stableforth, A.W. und Galloway, I.A.:
Infections diseases of animals due to bacteria
Butterworth, London (1959), Bd. 1, S. 176
- Schmude, D.E. von: Vergleich der alpha-Toxinbildung von
Stämmen des *Clostridium welchii* (perfringens)
in zwei von Logan und Mitarbeitern empfohlenen
Nährmedien.
Vet. med. Diss., Berlin FU (1971)
- Sheldon, D.R.; Moskowitz, M. und Deverell, M.W.:
Agar diffusion procedures for the assay of
lecithinase from *Clostridium perfringens*,
J. Bact. 77, 373 (1959)
- Smith, L.D.S. und Gardner, M.V.: The inhibition of the
lecithinase of *Clostridium perfringens* by
some reducing agents.
J. Franklin Inst. 250, 465 (1950)
- Todd, E.N.: The oxygen-labile haemolysin or theta-toxin of
Cl. welchii.
Brit. J. exp. Path. 22, 172 (1941)
- Van Heyningen, W.E.: I. Estimation of the alpha-toxin of
Cl. welchii type A.
Biochem. J. 35, 1246 (1941)
- II. Partial purification of the *Cl. welchii*
type A. Separation of alpha- and theta-
toxins
Biochem. J. 35, 1227 (1941)
- Bacterial toxins, Blackwell, Oxford (1950) S. 7
- Willis, A.T. und Hobbs, G.: Some new media for the isolation
and identification of clostridia.
J. Path. Bact. 77, 511 (1959)
- Willis, A.T. und Gowland, G.: Some observations on the mecha-
nism of Nagler reaction.
J. Path. Bact. 83, 219 (1962)
- Willis, A.T.: Clostridia of wound infection.
Butterworth, London (1969)
- Weinberg, M. und Barotte, J.: zitiert in Oakley, C.L.:
The toxins of *Clostridium welchii*
Bull. Hyg., 18, 781 (1943)

Herrn Prof. Dr. H. Hartwig möchte ich recht herzlich danken für die Überlassung des Themas und die in großzügiger Weise gewährte Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit.

Allen Angehörigen des Institutes möchte ich ebenfalls herzlich für ihre Hilfsbereitschaft danken.

Lebenslauf

Am 14. Mai 1931 wurde ich, Ursula Mechler, geb. Gossert in Lodz, als Tochter von Adolf Gossert und seiner Ehefrau Olga Gossert, geb. Ratajczyk, geboren.

Mit 7 Jahren bin ich in die deutsche Volksschule in Lodz eingeschult worden. Vom 4. Schuljahr an besuchte ich die Hauptschule in Lodz und ab Herbst 1945 die Hauptschule in Zwickau.

Vom 8. Schuljahr bis zum Abitur am 8. Juli 1950 besuchte ich den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig der Oberschule in Zwickau. Danach arbeitete ich in Zwickau und Berlin als Schwesternhelferin in Krankenhäusern.

Ab Wintersemester 1965/66 studierte ich an der Freien Universität Berlin Veterinärmedizin. Nach dem Wintersemester 1966/67 legte ich die Vorprüfung im naturwissenschaftlichen Abschnitt und nach dem Sommersemester 1967 die Vorprüfung im anatomisch-physiologischen Abschnitt ab. Nach dem Sommersemester 1968 bestand ich den 1. Abschnitt und nach dem Sommersemester 1969 den 2. Abschnitt der tierärztlichen Prüfung. Die praktische Ausbildung in der kurativen Praxis eines Tierarztes bekam ich vom 23.2. - 23.5.1970 bei Herrn Dr. Gruenberg, Berlin. Den 3. Abschnitt der tierärztlichen Prüfung beendete ich am 24.12.1970.

Seit dem 24.12.1970 bin ich am Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin als wissenschaftliche Assistentin tätig.

